

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TALITA PIASSA MAFESSONI

AVALIAÇÃO DA LACTATO DESIDROGENASE (LDH) E FOSFATASE
ALCALINA (ALP) SALIVAR EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA DE FANCONI

CURITIBA
2018

TALITA PIASSA MAFESSONI

AVALIAÇÃO DA LACTATO DESIDROGENASE (LDH) E FOSFATASE
ALCALINA (ALP) SALIVAR EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA DE FANCONI

Dissertação apresentada ao curso de
Pós-Graduação em Odontologia, Setor de
Ciências da Saúde, Universidade Federal
do Paraná, como requisito para obtenção
do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. José Miguel Amenábar Céspedes

CURITIBA
2018

Mafessoni, Talita Piassa

Avaliação da Lactato Desidrogenase (LHD) e Fosfatase Alcalina (ALP) salivar em indivíduos com Anemia de Fanconi / Talita Piassa Mafessoni – Curitiba, 2018.
59 f. ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. José Miguel Amenábar Céspedes
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde.
Universidade Federal do Paraná.

Inclui referência

1. Lactato Desidrogenase. 2. Fosfatase Alcalina. 3. Saliva. 4. Anemia de Fanconi. I. Amenábar Céspedes, José Miguel. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 616.99431

Maria da Conceição Kury da Silva – CRB – 9/1275



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ODONTOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **TALITA PIASSA MAFESSONI** intitulada: **AVALIAÇÃO DA LACTATO DESIDROGENOSE (LDH) E FOSFATASE ALCALINA (ALP) SALIVAR EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA DE FANCONI**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Agosto de 2018.



JOSÉ MIGUEL AMENÁBAR CÉSPEDES

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



JULIANA LUCENA SCHUSSEL

Avaliador Interno (UFPR)



ROBERTA TARGA STRAMANDINOLI ZANICOTTI

Avaliador Externo (HEG)

DEDICATÓRIA

À minha tia Graziela Cristina Piassa Giovanaz (in memoriam), pelo apoio em todas as áreas da minha vida e por se fazer presente o mais perto possível, dentro do meu coração.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me presentear diariamente com a vida, família e amigos, promovendo tantos momentos especiais. Agradeço pela saúde e sabedoria que permitiram que mais uma etapa importante se concluísse.

Aos meus pais, que sempre apoiaram minhas decisões, mesmo quando não parecia fazer sentido para eles, obrigada por confiarem em mim e me darem poder de escolha diante das opções. Por todas as vezes que abriram mão dos seus sonhos para realizar os meus e por sempre terem feito isso de coração pela minha felicidade.

Às minhas antigas amigas e também às novas, que construí nesse período. Sou grata pois sem vocês a caminhada não teria graça. Qualquer adversidade parece menor quando vocês estão por perto. Incluo também nesse grupo, a minha família, professores e todas as pessoas que de alguma maneira fazem parte da minha vida.

À Universidade Federal do Paraná, seu corpo docente, direção e administração, pela oportunidade de eu poder realizar o curso, e também pelo ambiente criativo e amigável que proporciona.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos e professores, Prof. Dr. Cassius Torres e Prof.^a Dra. Juliana Schussel, por terem feito parte da minha banca de qualificação, pelo paciente trabalho de revisão da redação, pelas suas correções e pelo suporte nesse tempo.

À minha banca examinadora, Prof.^a Dra. Juliana Schussel e Prof.^a Dra. Roberta S. Zanicotti, por aceitarem meu convite, pelo tempo dedicado a aperfeiçoar meu trabalho e pelo conhecimento compartilhado.

Ao meu orientador, que é uma das melhores pessoas, o qual tive o prazer de conhecer. Obrigada não só por partilhar seu conhecimento acadêmico comigo, mas também por contribuir com a minha formação pessoal. Agradeço pelas suas preocupações paternas, por nos enxergar como humanos antes de alunos ou orientados. Levarei seus conselhos por toda a vida, e tentarei aplicá-los. Não tenho palavras para agradecer por tanto.

E por fim, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

Um dos grandes desafios da atualidade é o diagnóstico precoce do câncer. Muitos estudos utilizam aspectos genéticos e metabólicos para auxiliar na detecção precoce e consequentemente, aumentar a sobrevivência dos indivíduos. Indivíduos com Anemia de Fanconi (AF) pertencem ao grupo de alto risco de câncer bucal, devido a predisposição genética para desenvolver neoplasias malignas na região de cabeça e pescoço. Do ponto de vista metabólico, o uso de enzimas envolvidas no metabolismo neoplásico, se apresenta como uma ferramenta viável para detectar alterações teciduais em fase inicial. A saliva é um fluido corporal com facilidade de obtenção e, no câncer bucal, pode ser uma ferramenta útil na busca de indicadores. Devido às características metabólicas da célula cancerígena, a alteração da concentração das enzimas Lactato Desidrogenase (LDH) e Fosfatase Alcalina (ALP) podem sugerir um possível processo de carcinogênese. O objetivo desse estudo foi avaliar a concentração de LDH e ALP em indivíduos com AF. Participaram deste estudo 73 indivíduos classificados em 4 grupos: 1) AF não transplantado sem lesão 2) AF transplantado sem lesão 3) AF transplantado com lesão potencialmente maligna e 4) participantes sem AF e sistemicamente saudáveis. Foram coletadas amostras de saliva não estimulada e avaliadas a atividade de LDH, ALP e concentração de proteínas totais salivares por meio de espectrofotometria. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no que diz respeito à atividade da ALP e a concentração de proteínas totais. Já com relação à LDH, os grupos controle e não transplantado se mostraram semelhantes e, houve diferença estatisticamente significativa quando estes foram comparados aos grupos transplantado com e sem lesão. Quando correlacionadas as atividades de LDH e ALP no grupo transplantado com lesão, a maioria dos casos apresentaram valores de LDH acima de 200 U/L e ALP abaixo de 9 U/L. Já no grupo transplantado sem lesão, os valores de LDH se mantiveram acima de 200 U/L na maioria dos casos, porém os valores de ALP foram acima de 9 U/L. Dentro dos limites do presente trabalho, pode-se concluir que a AF não modifica a concentração salivar das enzimas estudadas, no entanto, após o TCTH a concentração das enzimas aumenta significativamente. Por outro lado, o aumento da LDH concomitante à diminuição da ALP, parece estar associado à presença de lesões potencialmente malignas. Sugere-se que sejam realizados estudos longitudinais a fim de se verificar a real alteração dessas enzimas conforme o aparecimento das lesões.

Palavras-chave: Lactato Desidrogenase (LDH); Fosfatase Alcalina (ALP); Saliva; Anemia de Fanconi.

ABSTRACT

Nowadays, one of the greatest challenge is the early diagnosis of cancer. Many studies use genetic and metabolic aspects to aid in the early detection and consequently to increase the survival of individuals. Individuals with Fanconi Anemia (FA) belong to the high-risk group of oral cancer due to genetic predisposition to develop malignant neoplasms in the head and neck region. From the metabolic point of view, the use of enzymes involved in the neoplastic metabolism presents itself as a viable tool to detect early tissue changes. The saliva is a body fluid that is easy to obtain and in oral cancer can be a useful tool in the search for indicators. Due to the metabolic characteristics of the cancer cell, a change in the concentration of the enzymes Lactate Dehydrogenase (LDH) and Alkaline Phosphatase (ALP) may suggest a possible carcinogenic process. The objective of this study was to evaluate the concentration of LDH and ALP in individuals with AF. 73 individuals were classified into 4 groups: 1) non-transplanted AF without lesion 2) transplanted AF without lesion 3) transplanted AF with potentially malignant lesion and 4) non-AF and systemically healthy participants. Samples of non-stimulated saliva were collected and the activity of LDH, ALP and total salivary protein concentration were evaluated by spectrophotometry. There was not statistically significant difference between the groups regarding ALP activity and total protein concentration. Regarding LDH, the control and non-transplanted groups were similar and there was a statistically significant difference when they were compared to the transplanted groups with and without lesion. When LDH and ALP activities were correlated in the transplanted group with lesion, the majority of cases presented LDH values above 200 U / L and ALP below 9 U / L. In the transplanted group without lesions, the LDH values remained above 200 U / L in most cases, but the ALP values were above 9 U / L. Within the limits of the present study, we can conclude that FA does not modify the salivary concentration of the studied enzymes, however, after the HSCT the concentration of the enzymes increases significantly. However, the increase in LDH concomitant with the decrease in ALP seems to be associated with the presence of potentially malignant lesions. The study suggests to perform longitudinal studies to verify the actual alteration of these enzymes as the appearance of the lesions occurs.

KEYWORDS: Lactate Dehydrogenase (LDH); Alkaline Phosphatase (ALP); Saliva; Fanconi Anemia.

SUMARIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 8 |
| 1.1 | Anemia de Fanconi..... | 8 |
| 1.2 | Risco de desenvolvimento de câncer em indivíduos com anemia de Fanconi..... | 10 |
| 1.3 | Análise da atividade enzimática para diagnóstico do câncer..... | 12 |
| 1.3.1 | Glicólise..... | 12 |
| 1.3.2 | Lactato Desidrogenase (LDH) e Fosfatase Alcalina (ALP) salivares como indicadores de carcinogênese..... | 14 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 18 |
| 3 | CAPÍTULOS..... | 19 |
| 3.1 | Artigo 1: <i>Salivary lactate dehydrogenase (LDH) as a tool for early diagnosis of oral cancer in individuals with Fanconi anemia.....</i> | 20 |
| 3.2 | Artigo 2: <i>Avaliação da Lactato Desidrogenase (LDH) e Fosfatase Alcalina (ALP) salivar em indivíduos com anemia de Fanconi.....</i> | 23 |
| 4 | CONCLUSÃO..... | 42 |
| | REFERÊNCIAS..... | 48 |
| | APÊNDICE..... | 53 |
| | ANEXOS..... | 55 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Anemia de Fanconi

A Anemia de Fanconi (AF) é uma síndrome genética rara, predominantemente autossômica recessiva e raramente ligada ao X, com uma taxa de prevalência de 3 casos por milhão de habitantes. Sem predileção por raça ou sexo, a doença foi descrita pela primeira vez em 1927, pelo médico e pesquisador Guido Fanconi, o qual anos mais tarde descreveu a doença como uma anemia do tipo constitucional, caracterizada por anomalias congênitas, insuficiência progressiva da medula óssea e aumento do risco de câncer durante a fase adulta (FANCONI, 1967). A doença é chamada de anemia, pois apesar dos sinais e sintomas, sua principal manifestação é a falência medular óssea.

Quando comparado com a população geral, o risco para o desenvolvimento de malignidades foi estimado ser 50 vezes superior (ALTER, 2014). Isoladamente, o risco de desenvolvimento de leucemia mieloide aguda (LMA) e de carcinoma de células escamosas (CEC) na região da cabeça e pescoço é de 700 vezes maior (ALTER, 2014; MEHTA et al., 2015). A predisposição ao desenvolvimento de malignidades se deve a dificuldade de sinalização e reparo do DNA que os genes dos pacientes com AF apresentam, por estarem alterados (DONG et al., 2015).

O diagnóstico da AF é realizado por meio de observações clínicas e testes laboratoriais, os quais detectam quebras ou mutações a nível de DNA, sendo o principal realizado na coleta de sangue periférico. O teste considerado padrão ouro para diagnóstico, avalia a sensibilidade das células diante de

agentes clastogênicos como Diepoxibutano (DEB) e Mitomicina C (MMC). Em células normais ocorre um pequeno número de quebras cromossômicas e o DNA consegue se reparar quando tais agentes são adicionados. Em células oriundas de indivíduos com AF, essas quebras devem ser superiores a 0,74 (AUERBACH, 2009). Para confirmar o diagnóstico, é indicada uma análise de mutações para identificar qual o gene envolvido na doença e sua respectiva mutação (ALTER, 2005).

A expectativa de vida para indivíduos com AF tem sido estimada em aproximadamente 33 anos (ALTER et al., 2010), porém, os avanços no tratamento e o Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH), considerado o único recurso terapêutico com possibilidade de cura das complicações hematológicas, têm aumentado esta média (BONFIM et al., 2016). O TCTH consiste na infusão de células da medula óssea, sangue periférico ou cordão umbilical de um doador compatível para outro receptor (MACMILLAN et al., 2011; WINGARD et al., 2011). É necessário que o paciente passe por um regime de condicionamento com agentes citotóxicos e imunossupressores a fim de erradicar as células do receptor para que possa ocorrer a enxertia das células do doador e prevenir a Doença do Enxerto contra Hospedeiro (DECH) (WINGARD et al., 2011). Pacientes mais jovens, que receberam poucas transfusões ou nenhuma, que possuem doadores aparentados compatíveis ou aqueles em fase precoce da doença, possuem melhor prognóstico (MACMILLAN et al., 2011; WINGARD et al., 2011).

1.2 Risco de desenvolvimento de câncer em indivíduos com AF

As neoplasias, particularmente da cabeça e pescoço, pele, trato gastrointestinal e trato genitourinário, são mais comuns em indivíduos com AF. Em aproximadamente 14% dos pacientes adultos, o câncer pode ser a primeira manifestação da doença (KUTLER et al., 2003), sendo que o risco para o desenvolvimento de tumores sólidos é estimado em 76% aos 45 anos (ALTER, 2014). O câncer de boca apresenta uma prevalência significativa entre as neoplasias malignas e, no Brasil, é o sétimo tipo de câncer mais comum (WHO, 2012). Mesmo considerada uma doença com potencial de prevenção devido à facilidade de visualização das lesões, ainda é diagnosticada em estágio tardio (GUPTA et al., 2016; LIU et al., 2017), o que constitui a principal causa da alta taxa de mortalidade (GREIN CAVALCANTI et al., 2015a).

Indivíduos com AF apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de câncer bucal, mesmo na ausência dos fatores agravantes já conhecidos, como álcool e tabaco, uma vez que a predisposição ao tumor relaciona-se com alterações no reparo do DNA proveniente de sua doença de base e não necessariamente com os fatores de risco usuais (SMITH et al., 2010; ROMICK-ROSENDALE et al., 2013). Caracterizam-se alterações no ciclo celular mitótico e dano no reparo do DNA com grande instabilidade cromossômica e, algumas vezes, inativação de genes supressores de tumor (SMITH et al., 2010; SARODE et al., 2016). Isso explica a predisposição, e também, a hipersensibilidade à quimioterápicos específicos e radioterapia, por isso da necessidade do diagnóstico precoce para remoção cirúrgica total da lesão (SMITH et al., 2010; SARODE et al., 2016).

Alguns autores estimaram o risco para o desenvolvimento de neoplasias de cabeça e pescoço em 500-700 vezes maior quando comparados com a população geral (KUTLER et al., 2003; ROSENBERG et al., 2003; ALTER, 2014), sendo agravado o prognóstico em indivíduos mais velhos, transplantados, com histórico de DECH e que fizeram uso de terapia imunossupressora (ROSENBERG, 2005).

Durante o curso da doença ocorre aplasia medular progressiva, a qual tem como tratamento indicado o uso de medicação andrógena para aumentar o número de células sanguíneas e/ou TCTH (FURQUIM et al., 2014; PAUSTIAN et al., 2016; CHEUNG; TANIGUCHI, 2017). Após o TCTH ocorre o restabelecimento das células progenitoras da medula óssea, porém existem efeitos adversos a curto, médio e longo prazo. Dentre esses efeitos, a DECH pode ser manifestada.

Na boca, a DECH gera lesões que podem aparecer por um período ou intermitentemente por toda vida do indivíduo, tais lesões apresentam potencial de malignização (KRUSE; GRÄTZ, 2009; NOGUCHI et al., 2010; YUAN et al., 2016). Cerca de 35% a 60% dos pacientes apresentam úlceras dolorosas, eritema e atrofia da mucosa, sendo que muitas vezes, esses quadros podem sinalizar a presença da doença em outros órgãos (WOO et al., 1997; KUTENSHORRER et al., 2014). Em um estudo anterior, 96 pacientes com AF foram avaliados e foi encontrada uma prevalência de 42% de DECH bucal, sendo a placa branca a lesão mais frequente e, palato e mucosa jugal, os sítios de maior acometimento (GREIN CAVALCANTI et al., 2015b). Tais achados indicam que há um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer de

boca em pacientes com histórico de DECH quando comparados àqueles que não manifestaram a doença (CURTIS et al., 2005).

Existem lesões bucais que apresentam potencial de malignização, sendo as mais comuns líquen plano, queilite actínica, leucoplasias e eritroplasias. Dentre essas lesões, a prevalência de leucoplasia (lesões brancas não removíveis a raspagem) foi estimada em 12% dos casos de AF não transplantados, o que chama a atenção para a possibilidade desta lesão caracterizar um fenótipo da própria síndrome (GREIN CAVALCANTI et al., 2015a). Pacientes desse grupo que apresentam lesões brancas ou vermelhas malignizáveis com mais de 10 anos de idade são considerados de alto risco e devem ser avaliados clinicamente a cada 3 meses (FURQUIM et al., 2014; SMETSERS et al., 2015).

1.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA DIAGNÓSTICO DO CÂNCER

1.3.1 Glicólise

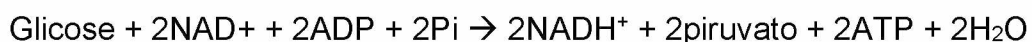
A glicose é o principal carboidrato em nossa dieta e assegura que todas as células tenham suporte energético contínuo e é também a fonte exclusiva de energia para as hemácias. A disponibilidade de glicose no sangue e a habilidade da mesma em gerar ATP tanto na presença quanto na ausência de oxigênio, é crucial para nossa economia energética. Nas células eucarióticas, a respiração celular é principalmente aeróbica, mas em alguns casos, as

células podem produzir energia de forma anaeróbica através da fermentação (ICARD et al., 2018).

A glicólise é umas das principais rotas para geração de energia para as células e está presente em todos os tipos de tecidos. É caracterizada por uma sequência de reações metabólicas, na qual a glicose é oxidada produzindo duas moléculas de piruvato, duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) e dois equivalentes reduzidos de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH^+) que serão introduzidos na cadeia respiratória ou na fermentação.

A oxidação da glicose a piruvato gera ATPs pela fosforilação (transferência de fosfato de intermediários de alta energia da via do ADP) a nível de substrato e NADH^+ . Subsequentemente, o piruvato pode ser oxidado a CO_2 no ciclo de Krebs e energia na forma de ATP gerada pela transferência de elétrons ao oxigênio na fosforilação oxidativa. Entretanto, se o piruvato e o NADH^+ gerados na glicólise forem convertidos a lactato (glicólise anaeróbica), moléculas de ATP podem ser geradas na ausência de oxigênio, através da fosforilação a nível de substrato (KORLA; MITRA, 2014).

Reação Global:



Nas células normais o processo de respiração/produção de energia ocorre pela via da fosforilação oxidativa durante o ciclo de Krebs (KORLA; MITRA, 2014). Um estudo realizado por Warburg em 1927 demonstrou que as células cancerígenas não utilizam a via convencional para produção de energia e seguem a via glicolítica anaeróbica que possui como produto final o ácido láctico pela quebra da molécula de piruvato através da enzima LDH. Estudos

explicam esse fenômeno por alterações em genes específicos de determinadas enzimas reguladoras do ciclo (ICARD et al., 2018). Este fenômeno é conhecido como efeito Warburg.

O efeito Warburg também favorece um pH alcalino intracelular que é uma força motriz em muitos aspectos da proliferação de células cancerígenas (aumento da glicólise e progressão do ciclo celular) e da agressividade do câncer (resistência a vários processos incluindo hipóxia, apoptose, drogas citotóxicas e resposta imune). Esse metabolismo leva a alterações epigenéticas e genéticas com a ocorrência de múltiplos novos fenótipos celulares que aumentam o crescimento e a agressividade das células cancerígenas (ICARD et al., 2018). Um nível aumentado de LDH pode significar que está ocorrendo uma alteração celular com consequente produção de ácido láctico ao invés da formação de ATP e CO₂. (WARBURG et al., 1927; DELL' ANTONE, 2012; TEKADE; SUN, 2017).

1.3.2 Lactato Desidrogenase (LDH) e Fosfatase Alcalina (ALP) salivares como indicadores de carcinogênese

Alguns componentes da saliva podem servir como indicadores para o diagnóstico de certas doenças sistêmicas, determinação da exposição a substâncias nocivas e avaliação geral da saúde e do estado de doença (SCHIPPER et al., 2007).

A LDH é uma enzima que ajuda no processo de transformação do açúcar em energia para as células e está presente em vários órgãos e tecidos, podendo ser liberada na saliva frente a um dano ou lesão (KORNBERG;

POLLIACK, 1980; D'CRUZ; PATHIYIL, 2015). Da mesma forma, a ALP também indica lesão ou morte celular e, caracteriza-se por ser uma enzima intracelular presente na saliva e na maioria dos tecidos, órgãos e ossos, incluindo as células epiteliais, inflamatórias, organismos bacterianos e células de tecido mineralizante (YOSHIE et al., 2007; DABRA; KAUSHIK, 2012; DABRA; SINGH, 2012).

Por estar em contato direto com as lesões orais, a análise da LDH e da ALP na saliva dos pacientes com AF surge como uma ferramenta útil (MEHTA et al., 2015; KALLALLI et al., 2016; SALUJA et al., 2016). Além da facilidade de monitoramento da progressão das lesões, tais enzimas não aparecem alteradas em situações de normalidade, devendo ser investigada a causa da alteração. Nos casos de câncer bucal, tais compostos salivares podem ser utilizados, auxiliando assim o diagnóstico, bem como o acompanhamento da progressão ou resolução da alteração (BASSALYK et al., 1992; SHPITZER et al., 2007; WANG et al., 2017).

Estudos anteriores analisaram e comprovaram a efetividade dessas enzimas como auxiliares no diagnóstico do câncer oral, comparando a atividade das mesmas conforme o grau de evolução das lesões (BASSALYK et al., 1992; D'CRUZ; PATHIYIL, 2015; PATEL; METGUD, 2015).

Diversos estudos mostraram valores aumentados de LDH e ALP na presença de alterações teciduais em mucosa bucal, principalmente no CEC e nas condições potencialmente malignas, como a leucoplasia e o líquen plano. Bassalyk e colaboradores (1992) descreveram o perfil e atividade da LDH e da ALP em neoplasias de boca, leucoplasia e controles saudáveis, com intuito de

desenvolver testes para detecção precoce, monitoramento e prognóstico do câncer bucal. Observaram que a atividade das enzimas foi 1,5 a 6 vezes maior em indivíduos com neoplasias malignas do que em pacientes saudáveis. Na leucoplasia também houve um aumento em relação ao grupo controle, porém ainda em menor nível quando comparados ao grupo com câncer.

Por outro lado, Acharya e colaboradores (2017) avaliaram os níveis séricos de ALP em pacientes com CEC em boca e a relação de sua atividade com as características clínico patológicas. Verificaram que o nível de ALP se apresentava aumentado quanto mais avançado o grau da neoplasia. Já Patel e Metgud (2015) avaliaram os níveis salivares de LDH em indivíduos com leucoplasia ou CEC, em comparação com controles saudáveis. A LDH salivar, quando comparada com os controles, apresentava valores aumentados nos casos de leucoplasia e um aumento ainda maior nos casos de CEC. A LDH salivar também aumentava conforme avançava o grau de diferenciação celular do carcinoma. Da mesma forma, Joshi e Golgire (2014) compararam grupos similares e obtiveram valores aumentados de LDH salivar coincidindo com o grau de displasia tecidual.

D'Cruz e Pathiyil (2015) também avaliaram a precisão da LDH salivar como biomarcador para o diagnóstico de CEC, correlacionando os níveis de LDH salivar com a diferenciação histológica da neoplasia. Os resultados mostraram níveis médios de LDH salivar de 117,33 no grupo controle, 355,83 no grupo de CEC bem diferenciado, 484,18 no grupo de CEC moderadamente diferenciado e 620,35 no grupo de CEC indiferenciado, mostrando

concordância entre os níveis salivares de LDH e diferenciação histológica do carcinoma de células escamosas.

Em um estudo semelhante da correlação da LDH salivar com a diferenciação histológica, Lokesh e colaboradores (2016) obtiveram valores médios de 497,00 no grupo controle e o aumento desse valor para 1225,40 entre os casos. Além disso, quando comparados os graus de diferenciação da neoplasia, os valores médios de LDH foram 1049,07 para carcinoma bem diferenciado, 1309,50 para moderadamente diferenciado e 1586,20 para indiferenciado, tendo correlação significativa com o grau histopatológico da neoplasia.

Atualmente são utilizadas avaliações clínicas e moleculares (FURQUIM et al., 2014; SMETSERS et al., 2015), ambas apresentam limitações, na clínica: a subjetividade do avaliador e a dificuldade de rastreamento das alterações visíveis; nas moleculares: o alto custo, a dificuldade e os erros que podem ocorrer durante o processamento do método. A utilização de indicadores apresenta a vantagem da possibilidade de acompanhamento tecidual antes da manifestação clínica, um recurso menos invasivo e rápido, além de não necessitar de ambiente específico para coleta da saliva (SAXENA et al., 2017).

Pacientes com AF são frequentemente submetidos a procedimentos invasivos, desde diagnóstico até tratamento. Nesse contexto, alternativas simplificadas devem ser pensadas a fim de melhorar a qualidade de vida desses indivíduos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo do estudo foi avaliar a concentração da atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH) e fosfatase alcalina (ALP) salivar em indivíduos com anemia de Fanconi.

2.2 Específicos

- Comparar a concentração da atividade enzimática da LDH, ALP e a concentração de proteína total salivar em indivíduos com e sem anemia de Fanconi;
- Comparar a concentração da atividade enzimática da LDH, ALP e a concentração de proteína total salivar em indivíduos com anemia de Fanconi não transplantados e transplantados, ambos sem lesões com potencial de malignidade;
- Comparar a concentração da atividade enzimática da LDH, ALP e a concentração de proteína total salivar em indivíduos com anemia de Fanconi transplantados com e sem lesões potencialmente malignas.

3. *CAPÍTULOS*

ARTIGO 2:

AVALIAÇÃO DA LACTATO DESIDROGENASE (LDH) E FOSFATASE
ALCALINA (ALP) SALIVAR EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA DE FANCONI

INTRODUÇÃO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma síndrome autossômica recessiva, rara, caracterizada por instabilidade cromossômica e dificuldade de reparo do DNA (1). A doença é chamada de anemia, pois apesar dos sinais e sintomas, sua principal manifestação é a diminuição das células sanguíneas pela medula óssea. O único recurso terapêutico com possibilidade de cura das complicações hematológicas é o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) seja por células da medula óssea, do sangue periférico ou do cordão umbilical (2).

Indivíduos com essa desordem podem apresentar complicações em vários órgãos e risco aumentado de malignidade (leucemia mielóide aguda e tumores sólidos). O carcinoma de células escamosas (CEC) de cabeça e pescoço é o mais comum entre os tumores sólidos (3). Acomete as mucosas da boca, nariz e garganta e, nos casos de Fanconi, seu desenvolvimento além de precoce, apresenta uma probabilidade 700 vezes maior do que na população geral, mesmo na ausência de fatores de risco conhecidos, como álcool e tabaco (4). As causas da alta incidência ainda não estão elucidadas, porém, as modificações diretas no DNA (5), as mutações em genes de reparo, a inflamação e a síntese de metabólitos carcinogênicos são as principais descrições encontradas na literatura (6).

Mesmo sendo considerada uma doença com potencial de prevenção, devido à facilidade de visualização das lesões, a alta taxa de mortalidade do câncer oral se deve principalmente ao atraso no diagnóstico (7,8). Alterações

na forma de lesões brancas ou vermelhas precedem quase todos os casos de câncer oral, sendo a leucoplasia mais prevalente (9,10).

Devido aos problemas hematológicos observados nos indivíduos com AF, métodos de diagnóstico simplificados devem ser pensados a fim de diminuir a necessidade de procedimentos invasivos. Nesse contexto, a utilização de indicadores salivares de carcinogênese seria uma alternativa viável.

Enzimas comumente analisadas no sangue, que indicam morte ou lesão celular, como a lactato desidrogenase (LDH) e a fosfatase alcalina (ALP), também podem ser obtidas na saliva, auxiliando assim o diagnóstico de câncer bucal (11,12). Estudos anteriores comprovaram aumento da atividade dessas enzimas na presença de lesões malignas ou com potencial de malignização (11,13,14). Frente a isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a concentração de LDH, ALP e proteína total salivar em indivíduos com AF.

MATERIAIS E MÉTODOS

Setenta e três indivíduos participaram deste estudo. O grupo de participantes com AF foi composto por 34 casos, os quais foram convidados a fazer parte do estudo no V Encontro Nacional de pacientes com Anemia de Fanconi realizado em Curitiba/PR em novembro de 2017. A amostra foi selecionada por conveniência e seguidos alguns critérios para coleta. O participante deveria estar há pelo menos 1 hora sem ingerir bebidas ou alimentos ou ter escovado os dentes; passar por um exame clínico a fim de diagnosticar lesões potencialmente malignas ou malignas e; responder a um

questionário informando se já havia realizado TCTH, o tipo do mesmo e o tempo de diagnóstico da desordem. Lesões brancas com diagnóstico clínico compatível com leucoplasia foram incluídos, embora não feita uma confirmação de diagnóstico através de exame histopatológico. Também foram incluídos pacientes com DECH bucal. Pacientes que não apresentavam essas condições e/ou não aceitaram participar, foram excluídos do estudo.

Os participantes foram classificados em 4 grupos: 1) AF não transplantado sem lesão 2) AF transplantado sem lesão 3) AF transplantado com condição com potencial de malignidade e 4) grupo controle, o qual foi composto por 39 participantes sem AF e sistemicamente saudáveis. O grupo controle foi selecionado na clínica de Odontologia da UFPR, de acordo com o sexo e a idade da amostra e ausência de lesão, diagnosticada através do mesmo exame clínico e por um único avaliador.

A coleta da saliva não estimulada foi realizada com intervalo de uma hora após a refeição e/ou higiene bucal, em recipientes estéreis, descartáveis e com gelo, por um período de 5 minutos, controlado pelo examinador com o auxílio de um cronômetro digital. O participante foi orientado a permanecer sentado verticalmente e orientado a deglutir a saliva presente na cavidade bucal antes do início da coleta. Após cada 30 segundos, a saliva secretada foi despejada dentro de um recipiente devidamente identificado.

Após a coleta, a amostra de saliva foi centrifugada a 2600g por 4 minutos para remover células escamosas e detritos. O sobrenadante resultante foi utilizado para posterior análise bioquímica. As amostras de saliva foram armazenadas em freezer a -80°C até serem analisadas.

A atividade da LDH foi determinada pela conversão do piruvato a lactato na presença de NADH. O decréscimo da absorbância em 340nm devido à oxidação do NADH é proporcional à atividade da LDH na amostra. A mensuração foi realizada por meio de kit específico (LDH Liquiform, Labtest diagnostica, Lagoa Santa/MG, Brasil). As leituras foram feitas a 340nm.

A atividade da ALP foi determinada mediante a reação colorimétrica com formação de complexo da cor amarela no meio alcalino. A mensuração foi realizada por meio de kit específico (Fosfatase alcalina, Labtest diagnostica, Lagoa Santa/MG, Brasil). As leituras foram feitas a 405nm.

A concentração de proteína total salivar foi avaliada pelo método de Biruteto, com a formação de um complexo da cor azul. As leituras foram realizadas em um comprimento de onda de 540nm. Todas as análises foram realizadas por meio de espectrofotometria (S-2000 UV - VIS, SP, Brasil).

Os dados coletados foram tabulados e organizados estatisticamente por meio do programa Statistical Package for the Social Sciences® (versão 19.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Na sequência testes estatísticos foram utilizados para averiguar a significância das diferenças entre o grupo de estudo e controle. Os resultados das variáveis foram analisados aplicando o teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. A significância foi considerada quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

O grupo de indivíduos com AF apresentou 15 homens e 19 mulheres enquanto que o grupo controle foi composto por 10 homens e 29 mulheres. No que diz respeito à idade, a média do grupo controle foi de $23,33 \pm 6,61$ anos. As médias de idade nos diferentes grupos de participantes com AF foram: $13,18 \pm 5,98$ anos nos indivíduos não transplantados; $17,30 \pm 8,84$ anos nos indivíduos transplantados sem lesão e $23,61 \pm 7,09$ anos nos indivíduos transplantados com lesão.

No que diz respeito ao tipo de doador, no grupo de indivíduos transplantados sem lesão teve 6 participantes que receberam TCTH de doadores aparentados e 4 de não aparentados. Já no grupo de indivíduos transplantados com lesão houve 8 participantes que receberam o TCTH de doadores aparentados e 5 de não aparentados.

O gráfico 1 apresenta a distribuição dos 73 participantes do estudo nos diferentes grupos.

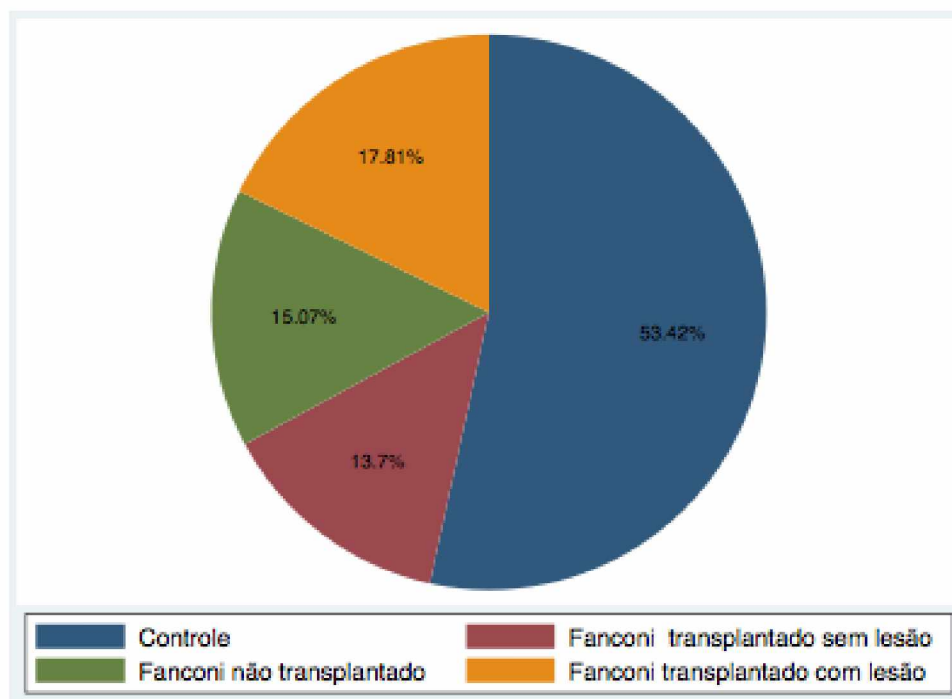


Grafico 1. Distribuição da amostra de acordo com a doença, TCTH e presença de lesão.

Com relação à LDH, o grupo controle apresentou resultados estatisticamente semelhantes ao grupo de indivíduos não transplantados. No entanto, houve diferença estatística significativa quando comparado aos grupos de indivíduos transplantados, independente de ter ou não lesão. Da mesma forma, houve diferença entre o grupo não transplantado com os grupos de casos transplantados. Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa no que diz respeito à atividade de ALP e a concentração de proteínas totais salivares entre os diferentes grupos. Os valores de mediana e percentil 25-75 de cada uma das variáveis avaliadas estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Mediana e percentil 25-75 das variáveis LDH, ALP e proteínas totais salivares entre os grupos.

| | Controle (39) | Anemia de Fanconi (34) | | |
|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--|
| | | Não TCTH (11) | Pós TCTH sem lesão (10) | Pós TCTH com lesão (13) |
| LDH (U/L) | 136,60 [68,8–178,00] ^{α,γ} | 89,04 [36,42-327,84] ^{β,δ} | 271,17 [122,43-455,34] ^{α,β} | 299,50 [205,35-495,81] ^{γ, δ} |
| ALP (U/L) | 11,00 [9,6–13,8] | 9,67 [4,14-11,05] | 11,05 [7,60-13,47] | 8,29 [6,21-10,02] |
| LDH (U/mg de proteína) | 0,321 [0,174-0,434] ^{α,γ} | 0,222 [0,090-0,824] ^{β,δ} | 0,706 [0,312-1,165] ^{α,β} | 0,747 [0,516-1,202] ^{γ, δ} |
| ALP (U/mg de proteína) | 0,027 [0,023–0,034] | 0,022 [0,010-0,027] | 0,028 [0,019-0,035] | 0,021 [0,015-0,025] |
| Proteína Total (mg/ml) | 0,404 [0,399–0,411] | 0,406 [0,399-0,441] | 0,387 [0,383-0,404] | 0,401 [0,392-0,410] |

Teste de Kruskal-Wallis, letras semelhantes indicam p<0,05.

Quando correlacionadas as atividades de LDH e de ALP no grupo transplantado com lesão, a maioria dos casos apresentaram valores de LDH acima de 200 U/L e ALP abaixo de 9 U/L. No grupo transplantado sem lesão, a maioria dos casos também apresentaram valores de LDH acima de 200 U/L, porém valores de ALP acima de 9 U/L. Os grupos controle e não transplantado apresentaram valores de LDH menores que 200 U/L e ALP até 20 U/L. (Gráfico 2.)

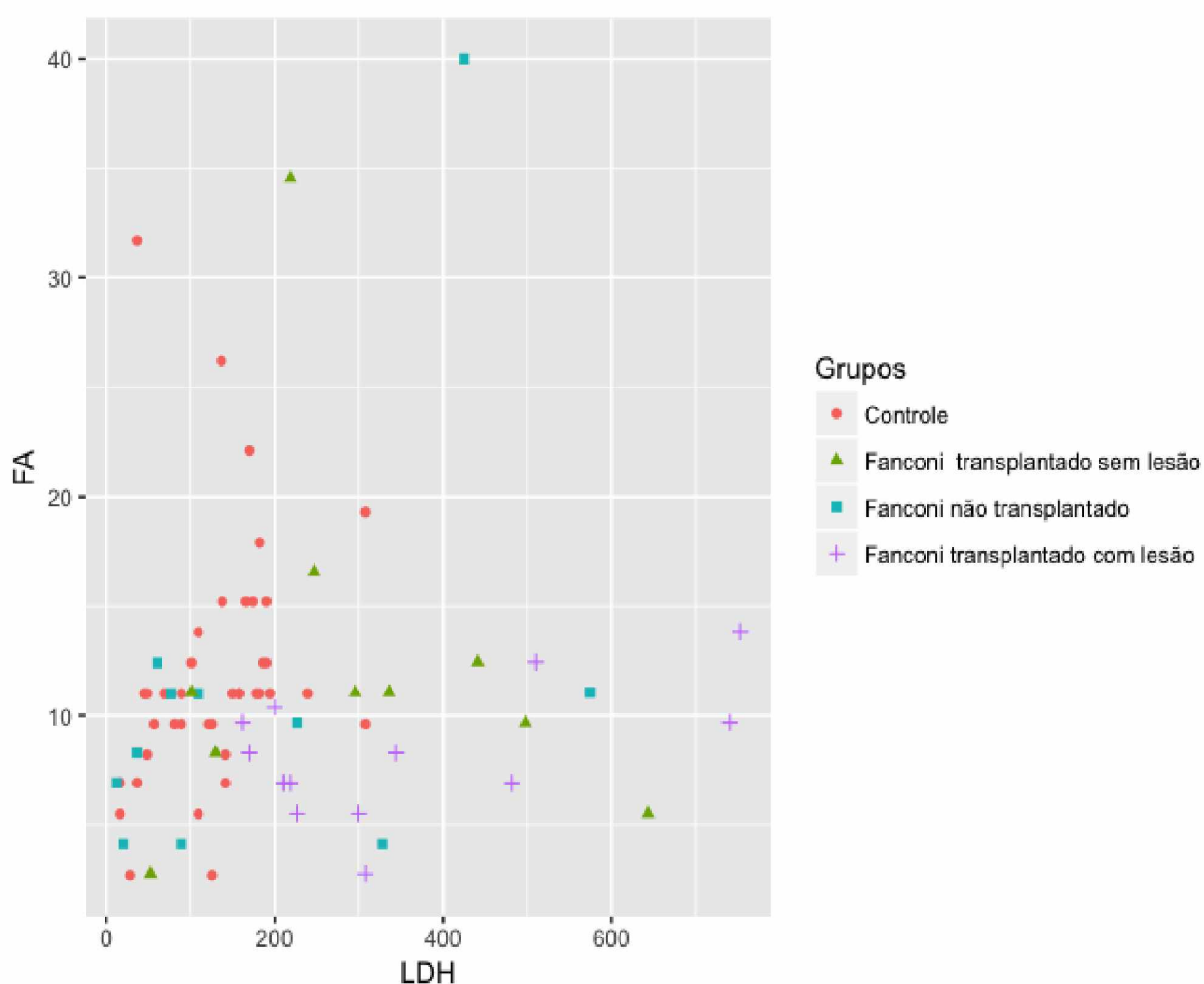


Gráfico 2. Correlação entre ALP e LDH nos diferentes grupos de estudo

Quando a análise é feita dentro do grupo de transplantados sem lesão e considerando o tipo de doador, foi observado que os participantes que receberam TCTH de doadores aparentados apresentaram valores de LDH, ALP e proteínas totais semelhantes aos grupos controle e não transplantado. Porém, os participantes que receberam TCTH de indivíduos não aparentados, apresentaram valores significativamente elevados de LDH (Tabela 2).

Por outro lado, quando comparados os grupos de indivíduos com AF pós TCTH com e sem lesão, considerando o tipo de doador, foram observados valores semelhantes de LDH, ALP e proteínas totais nos participantes que receberam TCTH de doadores não aparentados. Já a atividade da LDH salivar nos participantes que receberam TCTH de indivíduos aparentados, apresentou-se aumentada, com um $p=0,09$. (Tabela 3).

Tabela 2. Mediana e percentil 25-75 das variáveis LDH, ALP e proteínas totais salivares entre o grupo controle, grupo sem TCTH, grupo AF pós TCTH sem lesão com doador aparentado e grupo AF pós TCTH sem lesão com doador não aparentado.

| | Controle (39) | Anemia de Fanconi (21) | | |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|--|
| | | Não TCTH (11) | Pós TCTH sem lesão | |
| | | | Doador aparentado (6) | Doador não aparentado (4) |
| LDH (U/L) | 136,60 [68,8–178,00] ^α | 89,04 [36,42-327,84] ^β | 174,04 [89,04–259,03] ^γ | 469,51 [362,24-607,12] ^{α,β,γ} |
| ALP (U/L) | 11,00 [9,6–13,8] | 9,67 [4,14-11,05] | 11,05 [6,91-21,01] | 10,36 [6,56-12,08] |
| LDH (U/mg de proteína) | 0,321 [0,174-0,434] ^α | 0,222 [0,090-0,824] ^β | 0,450 [0,220-0,675] ^γ | 1,175 [0,938-1,558] ^{α,β,γ} |
| ALP (U/mg de proteína) | 0,027 [0,023–0,034] | 0,022 [0,010-0,027] | 0,028 [0,017-0,055] | 0,026 [0,017-0,032] |
| Proteína Total (mg/ml) | 0,404 [0,399–0,411] | 0,406 [0,399-0,441] | 0,390 [0,384-0,407] | 0,390 [0,382-0,410] |

Teste de Kruskal-Wallis, letras semelhantes indicam $p < 0,05$.

Tabela 3. Mediana e percentil 25-75 das variáveis LDH, ALP e proteínas totais salivares entre o grupo AF pós TCTH sem lesão e o grupo AF pós TCTH com lesão, por tipo de doador.

| | AF pós TCTH sem lesão - Doador | | AF pós TCTH com lesão – Doador | |
|------------------------|--------------------------------|-------------------------|--------------------------------|------------------------|
| | Aparentado (6) | Não aparentado (4) | Aparentado (8) | Não aparentado (5) |
| LDH (U/L) | 174,04 [89,04–259,03]* | 469,51 [362,24-607,12] | 263,05 [180,11-334,90]* | 481,65 [209,39-625,33] |
| ALP (U/L) | 11,05 [6,91-21,01] | 10,36 [6,56-12,08] | 7,60 [5,52-9,32] | 9,67 [6,91-11,41] |
| LDH (U/mg de proteína) | 0,450 [0,220-0,675] | 1,175 [0,938-1,558] | 0,649 [0,461-0,831] | 1,20 [0,520-1,545] |
| ALP (U/mg de proteína) | 0,028 [0,017-0,055] | 0,026 [0,017-0,032] | 0,020 [0,013-0,023] | 0,025 [0,017-0,027] |
| Proteína Total (mg/ml) | 0,390 [0,384-0,407] | 0,390 [0,382-0,410] | 0,399 [0,392-0,407] | 0,401 [0,394-0,417] |

Teste de Mann-Whitney, *p=0,093.

DISCUSSÃO

Pacientes com AF apresentam uma chance 700 vezes maior de desenvolver neoplasias, principalmente o CEC (4,15). Com o objetivo de diminuir a necessidade de procedimentos invasivos nesse grupo, a utilização da saliva ao invés do soro, pode ser uma alternativa eficaz na busca por indicadores da carcinogênese (13,16).

Através da saliva, é possível analisar alterações de macromoléculas específicas, como proteínas ou ácidos nucleicos (17). É um meio de fácil obtenção, apresenta a vantagem de estar em contato direto com as lesões orais, não submete os pacientes a perfurações adicionais, além de não apresentar muitas restrições para coleta. Uma pequena quantidade de amostra é necessária para auxiliar no diagnóstico e acompanhamento da evolução ou resolução da desordem. Enzimas como LDH e ALP que indicam morte ou lesão celular, também podem ser analisadas na saliva e se apresentarem como uma ferramenta útil no diagnóstico e monitoramento do câncer bucal. Estudos anteriores relataram aumento da atividade dessas enzimas em lesões malignas e potencialmente malignas (14,18). No entanto, este é o primeiro estudo a avaliar essas enzimas salivares em indivíduos com AF.

Para isso, o primeiro passo foi o estabelecimento de valores de referência para as enzimas analisadas no presente estudo. A partir desses valores, torna-se possível realizar estudos longitudinais, onde possa ser acompanhado o aumento ou manutenção da atividade enzimática, de acordo com a evolução das lesões e em conjunto com exames clínico patológicos.

Para avaliar se a LDH e a ALP podem ser utilizadas como indicadores de malignidade nos indivíduos com AF, primeiramente foi comparada a concentração destas enzimas entre indivíduos com AF não transplantados e controles saudáveis. Os resultados mostraram que não houve alteração na concentração das enzimas avaliadas, sugerindo que a presença da doença não afeta as concentrações salivares.

Na sequência foi verificado se o TCTH modificava a concentração destas enzimas na saliva. Quando comparados os grupos controle e não transplantado com o grupo transplantado, houve aumento unicamente nos níveis de LDH, já a ALP permaneceu estável. Isto sugere que o TCTH modifica a concentração de LDH salivar. Estudos anteriores já mostraram alterações em componentes salivares após o TCTH (19,20). Apesar de ser o único recurso terapêutico com possibilidade de cura das complicações hematológicas, o TCTH pode trazer consequências a curto, médio e longo prazo, devido a toxicidade que o mesmo provoca, sendo a boca acometida em 80% dos casos.

O TCTH está associado ao desenvolvimento da DECH. Sua forma aguda tende a se manifestar logo após a terapia. Na boca, cerca de 35% a 60% dos pacientes apresentam úlceras dolorosas (mucosite), eritema e atrofia da mucosa (10).

Alterações salivares também podem estar presentes após o TCTH. Um estudo avaliou as alterações salivares precoces em relação à mucosite oral em pacientes tratados com TCTH. Os níveis de fluxo salivar, proteína total, mucina 5B, albumina, IgA total, lactoferrina e mieloperoxidase foram determinados. Os

autores constataram que a composição geral da saliva foi alterada nos primeiros dias pós-TCTH, refletindo inflamação (20).

Com relação à DECH, Boer *et al.* (19), avaliaram prospectivamente o estado salivar inorgânico em diferentes períodos do TCTH alogênico na busca por possíveis biomarcadores para a patogênese da DECH crônica. Foram observadas alterações da composição inorgânica salivar nos períodos pós-TCTH, principalmente no período precoce pós-TCTH e no início da DECH, sugerindo a utilização de sódio (Na), cloreto (Cl) e fosfato (Pi) como contribuintes.

Porém, tais manifestações não são influenciadas pelo TCTH por si só. Há fatores relacionados a essa terapia que provocam desordens nos indivíduos receptores em maior ou menor grau de complexidade. Um desses fatores é o tipo de doador. Quando analisamos o subgrupo transplantado sem lesão e consideramos o tipo de doador, observamos que àqueles que receberam TCTH de doadores aparentados apresentaram valores enzimáticos semelhantes aos subgrupos controle e não transplantado. Já os que receberam TCTH de indivíduos não aparentados, apresentaram valores aumentados de LDH. De acordo com a literatura, a disparidade genética entre doador-receptor, é um fator crítico para o resultado do transplante e este pode alterar os níveis séricos de LDH. Paz *et al.* (21) avaliaram retrospectivamente as características e correlações dos doadores com a ocorrência de doença enxerto-hospedeiro aguda e crônica, sobrevida livre de doença e sobrevida global em uma população brasileira submetida ao TCTH, e constataram que a sobrevida global foi influenciada negativamente pela presença de TCTH não aparentado.

Outro estudo analisou os níveis séricos de LDH e ciclosporina A (CsA) como preditores da DECH em indivíduos submetidos ao TCTH para leucemia mielóide aguda (22). A análise mostrou que há associação entre as variáveis e a ocorrência de DECH. Um nível sérico de CsA mais alto e um menor nível sérico de LDH na terceira semana após o TCTH foram associados a uma menor incidência de DECH. Por outro lado, quando comparados os grupos de indivíduos com e sem lesão, considerando o tipo de doador, foram observados valores semelhantes de LDH, ALP e proteínas totais nos participantes que receberam TCTH de doadores não aparentados, sugerindo que as alterações nos níveis enzimáticos provocadas pelo TCTH oriundo de doadores não aparentados, pode mascarar a presença de lesões, que alterariam por si só a atividade dessas enzimas.

Por outro lado, quando avaliadas estas enzimas na presença de lesões potencialmente malignas, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Isto pode ser devido ao fato dos grupos possuírem um número relativamente pequeno de indivíduos devido à raridade da doença. No entanto, o grupo de indivíduos com lesão apresentou a mediana da concentração de LDH maior e de ALP menor do que o grupo sem lesão.

Joshi et al. relataram um aumento consistente nos níveis de LDH tanto no soro quanto na saliva de pacientes com leucoplasia e, um aumento ainda maior nos casos de CEC (23). Também há na literatura, relatos de atividade enzimática 1,5 a 6 vezes maior em indivíduos com neoplasias do que em pacientes saudáveis e, níveis de LDH e ALP aumentados de acordo com o grau de displasia tecidual (24). Swetha *et al.* (14) avaliaram os níveis séricos de

ALP em pacientes com CEC em boca e a relação de sua atividade com as características clínico patológicas. Em concordância com outros estudos, constataram níveis aumentados de ALP conforme o avanço da neoplasia.

Além disso, quando associadas a LDH e a ALP em cada um dos grupos, o grupo de indivíduos com AF com lesão apresentou maior número de casos com LDH acima de 200U/L e ALP abaixo de 9 U/L, sugerindo que a associação de ambas as enzimas pode ser um parâmetro interessante para acompanhar a progressão da doença. Observou-se uma tendência de alteração da atividade enzimática na presença de lesões, mesmo com um “n” reduzido em função da divisão dos casos em grupos.

De acordo com os resultados, se tratando novamente de TCTH, foi observado aumento da atividade da LDH em indivíduos transplantados. Sabe-se que o TCTH aumenta os riscos de desenvolvimento de CEC. Um estudo avaliou os riscos de CEC e morte em 145 pacientes com AF que não receberam TCTH, e em 117 pacientes com AF que receberam TCTH. Foi relatado risco de desenvolvimento de CEC, 4,4 vezes maior nos pacientes que receberam TCTH do que naqueles que não o fizeram (25). Um estudo conduzido na França, entre 1974 a 1991, estimou que existe um risco 22 vezes maior de desenvolvimento de tumores sólidos em pacientes transplantados do que na população geral. Os autores avaliaram 245 pacientes com Anemia Aplástica submetidos a TCTH (26).

Com base nisso, a saliva poderia novamente servir como indicador de malignização, através de um estudo longitudinal, em que os indivíduos com AF fossem acompanhados antes e após o TCTH, em intervalos de tempo

preestabelecidos. Além dos fatores abordados nesse estudo, indivíduos com AF apresentam outras peculiaridades e também, características comuns a indivíduos sem AF, que podem interferir nos achados salivares. Pode-se incluir a medicação utilizada, tanto para doença de base como para outras patologias, o tipo de TCTH, se é aparentado ou não aparentado, além de aspectos com a idade, o sexo e os próprios problemas bucais relacionados a microbiota.

4. CONCLUSÃO

Dentro dos limites do presente trabalho, pode-se concluir que a AF não modifica a concentração salivar das enzimas estudadas, diferentemente do TCTH. Por outro lado, o aumento da LDH concomitante à diminuição da ALP, está associado à presença de lesões bucais potencialmente malignas.

REFERÊNCIAS

- 1) Kee Y, D'Andrea AD. Molecular pathogenesis and clinical management of Fanconi anemia. J Clin Invest. 2012 Nov;122(11):3799-806.
- 2) de Medeiros CR, Bitencourt MA, Zanis-Neto J, Maluf EC, Carvalho DS, Bonfim CS, Funke VM, Setubal DC, Farah N, Pasquini R. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from an alternative stem cell source in Fanconi anemia patients: analysis of 47 patients from a single institution. Braz J Med Biol Res. 2006 Oct;39(10):1297-304.

- 3) Alter BP. Fanconi's anemia, transplantation, and cancer. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2014 Sep-Dec;27(3-4):214-21.
- 4) Mehta A, Chawla D, Kaur J, Mahajan V, Guglani V. Salivary lactate dehydrogenase levels can provide early diagnosis of hypoxic-ischaemic encephalopathy in neonates with birth asphyxia. *Acta Paediatr.* 2015 Jun;104(6):e236-40.
- 5) Bebek G, Bennett KL, Funchain P, Campbell R, Seth R, Scharpf J, Burkey B, Eng C. Microbiomic subprofiles and MDR1 promoter methylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Mol Genet.* 2012 Apr 1;21(7):1557-65.
- 6) Goodman B, Gardner H. The microbiome and cancer. *J Pathol.* 2018 Apr;244(5):667-676.
- 7) Gupta N, Gupta R, Acharya AK, Patthi B, Goud V, Reddy S, Garg A, Singla A. Changing Trends in oral cancer - a global scenario. *Nepal J Epidemiol.* 2016 Dec 31;6(4):613-619.
- 8) Liu SA, Wang CC, Jiang RS, Lee FY, Lin WJ, Lin JC. Pathological features and their prognostic impacts on oral cavity cancer patients among different subsites - A single institute's experience in Taiwan. *Sci Rep.* 2017 Aug 7;7(1):7451.
- 9) Grein Cavalcanti L, Lyko KF, Araújo RL, Amenábar JM, Bonfim C, Torres-Pereira CC. Oral leukoplakia in patients with Fanconi anaemia without hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer.* 2015 Jun;62(6):1024-6.

- 10) Grein Cavalcanti L, Fuentes Araújo RL, Bonfim C, Torres-Pereira CC. Oral manifestations compatible with chronic graft-versus-host disease in patients with Fanconi anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Feb;21(2):275-80.
- 11) Shpitzer T, Bahar G, Feinmesser R, Nagler RM. A comprehensive salivary analysis for oral cancer diagnosis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2007 Sep;133(9):613-7.
- 12) Wang X, Kaczor-Urbanowicz KE, Wong DT. Salivary biomarkers in cancer detection. *Med Oncol*. 2017 Jan;34(1):7.
- 13) Lokesh K, Kannabiran J, Rao MD. Salivary Lactate Dehydrogenase (LDH) - A Novel Technique in Oral Cancer Detection and Diagnosis. *J Clin Diagn Res*. 2016 Feb;10(2):ZC34-7.
- 14) Acharya S, Kale J, Rai P, Anehosur V, Hallikeri K. Serum alkaline phosphatase in oral squamous cell carcinoma and its association with clinicopathological characteristics. *South Asian J Cancer*. 2017 Jul-Sep;6(3):125-128.
- 15) Alter BP. Fanconi anemia and the development of leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2014 Sep-Dec;27(3-4):214-21.
- 16) Saxena S, Sankhla B, Sundaragiri KS, Bhargava A. A Review of Salivary Biomarker: A Tool for Early Oral Cancer Diagnosis. *Adv Biomed Res*. 2017 Jul 28;6:90.
- 17) Markopoulos AK, Michailidou EZ, Tzimagiorgis G. Salivary markers for oral cancer detection. *Open Dent J*. 2010;4:172-8.

- 18) Kallalli BN, Rawson K, Muzammil, Singh A, Awati MA, Shivhare P. Lactate dehydrogenase as a biomarker in oral cancer and oral submucous fibrosis. *J Oral Pathol Med*. 2016 Oct;45(9):687-690.
- 19) Boer CC, Correa ME, Tenuta LM, Souza CA, Vigorito AC. Post-allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) changes in inorganic salivary components. *Support Care Cancer*. 2015 Sep;23(9):2561-7.
- 20) van Leeuwen S, Proctor GB, Potting C, Ten Hoopen S, van Groningen L, Bronkhorst EM, Blijlevens N, Huysmans M. Early salivary changes in multiple myeloma patients undergoing autologous HSCT. *Oral Dis*. 2018 Apr 10.
- 21) Paz A, Rigoni L, Fischer G, Schittler M, Pezzi A, Valim V, Dahmer A, Zambonato B, Amorin B, Sehn F, Silva MAD, Daudt L, Silla L. Donor characteristics and hematopoietic stem cell transplantation outcome: experience of a single center in Southern Brazil *Hematol Transfus Cell Ther*. 2018 Apr-Jun;40(2):136-142.
- 22) Song MK, Chung JS, Seol YM, Kwon BR, Shin HJ, Choi YJ, Cho GJ. Influence of lactate dehydrogenase and cyclosporine A level on the incidence of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *J Korean Med Sci*. 2009 Aug;24(4):555-60.
- 23) Joshi PS, Golgire S. A study of salivary lactate dehydrogenase isoenzyme levels in patients with oral leukoplakia and squamous cell carcinoma by gel electrophoresis method. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2014 Sep;18(Suppl 1):S39-44.

- 24) Bassalyk LS, Gus'kova NK, Pashintseva LP, Liubimova NV. Enzyme and isoenzyme activity in patients with malignant tumors of the oral mucosa. *Vopr Onkol.* 1992;38(3):291-9.
- 25) Rosenberg PS, Socié G, Alter BP, Gluckman E. Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. *Blood.* 2005 Jan 1;105(1):67-73.
- 26) Socié G, Henry-Amar M, Devergie A, Wibault P, Neiger M, Cosset JM, Gluckman E. Poor clinical outcome of patients developing malignant solid tumors after bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. *Leuk Lymphoma.* 1992 Aug;7(5-6):419-23.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise de biomarcadores na saliva continua sendo uma área promissora de pesquisa. Por isso, estabelecer valores de referência, constitui o primeiro passo de qualquer avanço nesse sentido, e assim, posteriormente, desenvolver técnicas mais precisas e rápidas que sejam aplicáveis no próprio consultório médico ou odontológico durante as consultas de rotina.

Simultaneamente, conhecer a atividade enzimática salivar na doença, e após o tratamento, são necessários para poder identificar e aprimorar técnicas que permitam o uso destas enzimas como indicadores de progressão de lesões com potencial de malignidade.

Dentro dos limites do presente trabalho, pode-se concluir que a AF não modifica a concentração salivar das enzimas estudadas, diferentemente do tipo de doador para o TCTH. Por outro lado, o aumento da LDH concomitante à diminuição da ALP, parece estar associado à presença de lesões potencialmente malignas.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, S.; KALE, J.; RAI, P.; ANEHOSUR, V.; HALLIKERI, K. **Serum alkaline phosphatase in oral squamous cell carcinoma and its association with clinicopathological characteristics**. South Asian J Cancer, v. 6, n. 3, p. 125–128, 2017.
- ALTER, B. P. **Fanconi's anemia, transplantation, and cancer**. Pediatr Transplant, v. 9, n. 7, p. 81-6, 2005.
- ALTER, B. P.; GIRI, N.; SAVAGE, S. A.; et al. **Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study**. Br J Haematol, v. 150, n. 2, p. 179-88, 2010.
- ALTER, B. P. **Fanconi anemia and the development of leukemia**. Best Pract Res Clin Haematol, v. 27, n. 3-4, p. 214-21, 2014.
- AUERBACH, A. D. **Fanconi anemia and its diagnosis**. Curr Protoc Hum Genet, v. 85, n. 8.7, p. 1-17, 2015.
- BASSALYK, L. S.; GUSKOVA, N. K.; PASHINTSEVA, L. P.; LIUBIMOVA, N. V. **Enzyme and isoenzyme activity in patients with malignant tumors of the oral mucosa**. Vopr Onkol, v. 38, n. 3, p. 291-9, 1992.
- BONFIM, C.; RIBEIRO, L.; NICHELE, S.; et al. **Long-term Survival, Organ Function, and Malignancy after Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Fanconi Anemia**. Biol Blood Marrow Transplant, v. 22, n. 7, p. 1257-1263, 2016.
- CHEUNG, R.S.; TANIGUCHI, T. **Recent insights into the molecular basis of Fanconi anemia: genes, modifiers, and drivers**. Int J Hematol, v. 106, n. 3, p. 335-344, 2017.
- CURTIS, R. E.; METAYER, C.; RIZZO, J. D.; et al. **Impact of chronic GVHD therapy on the development of squamous-cell cancers after hematopoietic stem-cell transplantation: An international case-control study**. Blood, v. 105, n. 10, p. 3802-11, 2005.
- D'CRUZ, A. M.; PATHIYIL, V. **Histopathological differentiation of oral squamous cell carcinoma and salivary lactate dehydrogenase: A biochemical study**. South Asian J Cancer, v. 4, n. 2, p. 58–60, 2015.
- DABRA, S.; KAUSHIK, A. **Salivary enzymes as diagnostic markers for detection of gingival / periodontal disease and their correlation with the severity of the disease**. J Indian Soc Periodontol, v. 16, n. 3, p. 358-64, 2012.
- DABRA, S.; SINGH, P. **Evaluating the levels of salivary alkaline and acid phosphatase activities as biochemical markers for periodontal disease: A case series**. Dent Res J (Isfahan), v. 9, n. 1, p. 41-5, 2012.

DELL'ANTONE, P. **Energy metabolism in cancer cells: How to explain the Warburg and Crabtree effects?** Med Hypotheses, v. 79, n. 3, p. 388–392, 2012.

DONG, H.; NEBERT, D. W.; BRUFORD, E. A.; et al. **Update of the human and mouse Fanconi anemia genes TL - 9.** Hum Genomics, v. 24, n. 9, p. 32, 2015.

FANCONI, G. **Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi's anemia (F. A.). I. Clinical aspects.** Semin Hematol, v. 4, n. 3, p. 233–40, 1967.

FURQUIM, C. P.; PIVOVAR, A.; CAVALCANTI, L. G.; et al. **Mouth self-examination as a screening tool for oral cancer in a high-risk group of patients with Fanconi anemia.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, v. 118, n. 4, p. 440–6, 2014.

GREIN CAVALCANTI, L.; LYKO, K. F.; ARAÚJO, R. L. F.; et al. **Oral leukoplakia in patients with Fanconi anaemia without hematopoietic stem cell transplantation.** Pediatr Blood Cancer, v. 62, n. 6, p. 1024–1026, 2015a.

GREIN CAVALCANTI L, FUENTES ARAÚJO RL, BONFIM C, TORRES-PEREIRA CC. **Oral manifestations compatible with chronic graft-versus-host disease in patients with Fanconi anemia.** Biol Blood Marrow Transplant, v. 21, n. 2, p. 275–80, 2015b.

GUPTA, N.; GUPTA, R.; ACHARYA, A. K.; et al. **Changing Trends in oral cancer - a global scenario.** Nepal J Epidemiol, v. 6, n. 4, p. 613–619, 2016.

ICARD, P.; SHULMAN, S.; FARHAT, D.; et al. **How the Warburg effect supports aggressiveness and drug resistance of cancer cells?** Drug Resist Updat, v. 38, n. 1, p. 11, 2018.

JOSHI, P.; GOLGIRE, S. **A study of salivary lactate dehydrogenase isoenzyme levels in patients with oral leukoplakia and squamous cell carcinoma by gel electrophoresis method.** J Oral Maxillofac Pathol, v. 18, n. 1, p. 39–44, 2014.

KALLALLI, B. N.; RAWSON, K.; MUZAMMIL; et al. **Lactate dehydrogenase as a biomarker in oral cancer and oral submucous fibrosis.** J Oral Pathol Med, v. 45, n. 9, p. 687–690, 2016.

KORLA, K.; MITRA, C. K. **Modelling the Krebs cycle and oxidative phosphorylation.** J Biomol Struct Dyn, v. 32, n. 2, p. 242–56, 2014.

KORNBERG, A.; POLLIACK, A. **Serum lactic dehydrogenase (LDH) levels in acute leukemia: marked elevations in lymphoblastic leukemia.** Blood, v. 56, n. 3, p. 351–5, 1980.

KRUSE, A. L.; GRÄTZ, K. W. **Oral carcinoma after hematopoietic stem cell transplantation – a new classification based on a literature review over 30 years.** Head Neck Oncol, v. 1, n. 1, p. 29, 2009.

KUTEN-SHORRER, M.; WOO, S. B.; TREISTER, N. S. **Oral graft-versus-host disease**. Dent Clin North Am, v. 58, n. 2, p. 351-68, 2014.

KUTLER, D. I.; AUERBACH, A. D.; SATAGOPAN, J.; et al. **High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia**. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, v. 129, n. 1, p. 106-12, 2003.

LIU, S.-A.; WANG, C.-C.; JIANG, R.-S.; et al. **Pathological features and their prognostic impacts on oral cavity cancer patients among different subsites - A single institute's experience in Taiwan**. Sci Rep, v. 7, n. 1, p. 7451, 2017.

LOKESH, K.; KANNABIRAN, J.; RAO, M. D. **Salivary Lactate Dehydrogenase (LDH) - A Novel Technique in Oral Cancer Detection and Diagnosis**. J Clin Diagn Res, v. 10, n. 2, p. ZC34-7, 2016.

MACMILLAN, M. L.; HUGHES, M. R.; AGARWAL, S.; DALEY, G. Q. **Cellular therapy for fanconi anemia: the past, present, and future**. Biol Blood Marrow Transplant, v. 17, n. 1, p. S109-14, 2011.

MEHTA, A.; CHAWLA, D.; KAUR, J.; MAHAJAN, V.; GUGLANI, V. **Salivary lactate dehydrogenase levels can provide early diagnosis of hypoxic-ischaemic encephalopathy in neonates with birth asphyxia**. Acta Paediatr, v. 104, n. 6, p. e236-40, 2015.

NOGUCHI, K.; NAKASE, M.; INUI, M.; et al. **A case of tongue carcinoma associated with chronic graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation**. Aust Dent J, v. 55, n. 2, p. 200-202, 2010.

PATEL, S.; METGUD, R. **Estimation of salivary lactate dehydrogenase in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: a biochemical study**. J Cancer Res Ther, v. 11, n. 1, p. 119-23, 2015.

PAUSTIAN, L.; CHAO, M. M.; HANENBERG, H.; et al. **Androgen therapy in Fanconi anemia: A retrospective analysis of 30 years in Germany**. Pediatr Hematol Oncol, v. 33, n. 1, p. 5-12, 2016.

ROMICK-ROSENDALE, L. E.; LUI, V. W. Y.; GRANDIS, J. R.; WELLS, S. I. **The Fanconi anemia pathway: repairing the link between DNA damage and squamous cell carcinoma**. Mutat Res, v. 743-744, p. 78-88, 2013.

ROSENBERG, P. S.; GREENE, M. H.; ALTER, B. P. **Cancer incidence in persons with Fanconi anemia**. Blood, v. 101, n. 3, p. 822-6, 2003.

ROSENBERG, P. S. **Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants**. Blood, v. 105, n. 1, p. 67-73, 2005.

SALUJA, T. S.; SPADIGAM, A.; DHUPAR, A.; SYED, S. **Equating salivary lactate dehydrogenase (LDH) with LDH-5 expression in patients with oral squamous cell carcinoma: An insight into metabolic reprogramming of**

cancer cell as a predictor of aggressive phenotype. Tumour Biol, v. 37, n. 4, p. 5609–20, 2016.

SARODE, G. S.; BATRA, A.; SARODE, S. C.; YERAWADEKAR, S.; PATIL, S. **Oral Cancer-related Inherited Cancer Syndromes: A Comprehensive Review.** J Contemp Dent Pract, v. 17, n. 6, p. 504–10, 2016.

SAXENA, S.; SANKHLA, B.; SUNDARAGIRI, K. S.; BHARGAVA, A. **A Review of Salivary Biomarker: A Tool for Early Oral Cancer Diagnosis.** Adv Biomed Res, v. 6, n. 1, p. 90, 2017.

SCHIPPER, R. G.; SILLETTI, E.; VINGERHOEDS, M. H. **Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects.** Arch Oral Biol, v. 52, n. 12, p. 1114-35, 2007.

SHPITZER, T.; BAHAR, G.; FEINMESSER, R.; NAGLER, R. M. **A comprehensive salivary analysis for oral cancer diagnosis.** J Cancer Res Clin Oncol, v. 133, n. 9, p. 613-7, 2007.

SMETSERS, S. E.; VELLEUER, E.; DIETRICH, R.; et al. **Noninvasive molecular screening for oral precancer in Fanconi anemia patients.** Cancer Prev Res (Phila), v. 8, n. 11, p. 1102–11, 2015.

SMITH, I. M.; MITHANI, S. K.; MYDLARZ, W. K.; CHANG, S. S.; CALIFANO, J. A. **Inactivation of the tumor suppressor genes causing the hereditary syndromes predisposing to head and neck cancer via promoter hypermethylation in sporadic head and neck cancers.** ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, v. 72, n. 1, p. 44–50, 2010.

TEKADE, R. K.; SUN, X. **The Warburg effect and glucose-derived cancer theranostics.** Drug Discov Today, v. 22, n. 11, p. 1637-1653, 2017.

WANG, X.; KACZOR-URBANOWICZ, K. E.; WONG, D. T. W. **Salivary biomarkers in cancer detection.** Med Oncol, v. 34, n. 1, p. 7, 2017.

WARBURG, O.; WIND, F.; NEGELEIN, E. **The Metabolism of Tumors in the Body.** J Gen Physiol, v. 8, n. 6, p. 519–30, 1927.

WHO. GLOBOCAN 2012: **Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.** International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx>. Acesso em: 4/9/2017.

WINGARD, J. R.; HSU, J.; HIEMENZ, J. W. **Hematopoietic Stem Cell Transplantation: An Overview of Infection Risks and Epidemiology.** Hematol Oncol Clin North Am, v. 25, n. 1, p. 101-16, 2011.

WOO, S. B.; LEE, S. J.; SCHUBERT, M. M. **Graft-vs.-host disease.** Crit Rev Oral Biol Med, v. 8, n. 2, p. 201-16, 1997.

YOSHIE, H.; TAI, H.; KOBAYASHI, T.; et al. **Salivary Enzyme Levels After Scaling and Interleukin-1 Genotypes in Japanese Patients With Chronic Periodontitis**. J Periodontol, v. 78, n. 3, p. 498-503, 2007.

YUAN, A.; CHAI, X.; MARTINS, F.; et al. **Oral chronic GVHD outcomes and resource utilization: a subanalysis from the chronic GVHD consortium**. Oral Dis, v. 22, n. 3, p. 235–240, 2016.

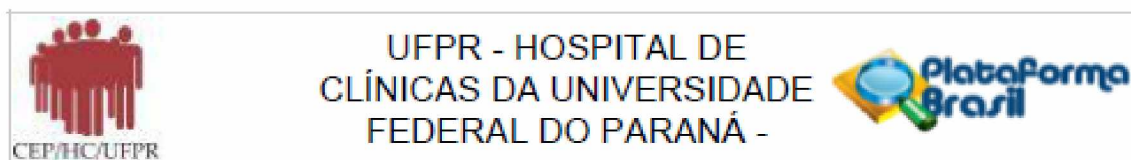
APÊNDICE

Quadro 1. Características dos participantes com Anemia de Fanconi

| Casos com AF | Sexo | Idade | Tempo de Diagnóstico da AF | TCTH | TIPO DE TCTH | Tempo de TCTH | Presença de Lesão | LDH | ALP |
|--------------|------|-------|----------------------------|------|--------------|---------------|-------------------|--------|-------|
| 1 | F | 23 | 2 anos | SIM | NAP | 1 ano | X | 295,46 | 11,05 |
| 2 | F | 30 | 5 anos | SIM | AP | 5 anos | X | 129,52 | 8,29 |
| 3 | M | 12 | 2 anos | SIM | NAP | 6 meses | X | 441,17 | 12,43 |
| 4 | F | 29 | 25 anos | SIM | AP | 23 anos | X | 101,18 | 11,05 |
| 5 | F | 20 | 11 anos | SIM | NAP | 10 anos | X | 335,94 | 11,05 |
| 6 | F | 16 | 11 anos | NÃO | --- | --- | X | 93 | 5,52 |
| 7 | F | 26 | 15 anos | SIM | AP | 14 anos | SIM | 752,83 | 13,82 |
| 8 | F | 23 | 14 | SIM | AP | 14 | SIM | 210,47 | 6,91 |
| 9 | M | 15 | 10 | NÃO | --- | --- | X | 327,84 | 4,14 |
| 10 | M | 11 | 5 anos | NÃO | --- | --- | X | 574,74 | 11,05 |
| 11 | M | 17 | 8 | SIM | NAP | 7 | X | 740,69 | 9,67 |
| 12 | M | 10 | 1 ano | SIM | NAP | 6 meses | X | 643,55 | 5,52 |
| 13 | F | 11 | 4 anos | SIM | AP | 3 anos | X | 218,56 | 34,55 |
| 14 | F | 13 | 7 anos | NÃO | ---- | ----- | X | 424,98 | 40 |
| 15 | M | 9 | 2 | SIM | AP | 1 ano | X | 246,89 | 16,58 |
| 16 | F | 10 | 2 | SIM | AP | 1 ano | X | 52,61 | 2,76 |
| 17 | F | 13 | 2 | SIM | NAP | 1 | X | 497,84 | 9,67 |
| 18 | M | 12 | 11 anos | SIM | NAP | 9 anos | SIM | 20,23 | 1,38 |

| | | | | | | | | | |
|----|---|----|---------|-----|------|------------|-----|--------|-------|
| 19 | F | 26 | 8 anos | NÃO | ---- | ---- | X | 509,98 | 12,43 |
| 20 | F | 10 | --- | NÃO | ---- | ---- | X | 89,045 | 4,14 |
| 21 | M | 7 | 4 anos | NÃO | ---- | ---- | X | 20,23 | 4,14 |
| 22 | M | 9 | 2 anos | NÃO | ---- | ---- | X | 76,90 | 11 |
| 23 | F | 28 | 9 anos | NÃO | ---- | ---- | X | 60,71 | 12,4 |
| 24 | M | 9 | 8 anos | NÃO | ---- | ---- | X | 12,14 | 6,91 |
| 25 | M | 17 | 2 anos | NÃO | | | X | 36,42 | 8,29 |
| 26 | F | 17 | 5 anos | NÃO | ---- | ---- | X | 226,66 | 9,67 |
| 27 | F | 9 | 4 anos | NÃO | ---- | ---- | X | 109,28 | 11 |
| 28 | M | 28 | 23 anos | SIM | AP | 19 anos | SIM | 344 | 8,29 |
| 29 | M | 23 | 12 anos | SIM | AP | 1 ano | SIM | 299,5 | 5,52 |
| 30 | M | 22 | 11 anos | SIM | AP | 8 anos | SIM | 60,7 | 1,38 |
| 31 | F | 21 | 16 anos | SIM | NAP | 14 anos | SIM | 481,65 | 6,91 |
| 32 | M | 22 | 19 anos | SIM | AP | 14 anos | SIM | 226,6 | 5,52 |
| 33 | F | 13 | 9 anos | SIM | NAP | 7 anos | SIM | 218,56 | 6,91 |
| 34 | M | 19 | 8 anos | SIM | AP | 4 anos | SIM | 28,33 | 6,91 |
| 35 | F | 36 | 25 anos | SIM | AP | 22 anos | SIM | 169,99 | 8,29 |
| 36 | F | 36 | --- | SIM | AP | 29 anos | SIM | 161,9 | 9,67 |
| 37 | M | 14 | 10 anos | SIM | AP | 4 anos | SIM | 307,61 | 2,76 |

ANEXOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de parâmetros salivares em indivíduos com anemia de Fanconi

Pesquisador: José Miguel Amenábar Céspedes

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 80076617.2.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.426.777

Apresentação do Projeto:

Estudo a ser desenvolvido pela aluna Talita Piassa Mafessoni do curso de Mestrado em Odontologia e pela Profa Dra. Chamindie Punyadeera como colaboradora.

SOB O TÍTULO: Avaliação de parâmetros salivares em indivíduos com anemia de Fanconi.

Este projeto será realizado no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas/UFPR; no Laboratório de Bioquímica Bucal/UFPR e na Queensland

University of Technology, no período de Março de 2018 a Dezembro de 2020. Os

"participantes da casuística" serão pacientes com falência medular (anemia de Fanconi e

anemia aplástica severa) e alto risco de transformação maligna (anemia de Fanconi e

disqueratose congênita) atendidos no ambulatório do Serviço de Transplante de Medula

Óssea (STMO) do Hospital de Clínicas da UFPR. Os participantes com AF apresentam alteração no pH

salivar, na capacidade tampão salivar, os níveis de lactato desidrogenase salivar, fosfatase alcalina salivar e

metilação do DNA em cinco genes supressores de tumores (RASSF1a, p16 INK4a, TIMP3, PCQAP / MED15), quando comparados com outros participantes com falência medular.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o pH, capacidade tampão, níveis de lactato desidrogenase e fosfatase alcalina salivar e a

Endereço: Rua Gal. Camello, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

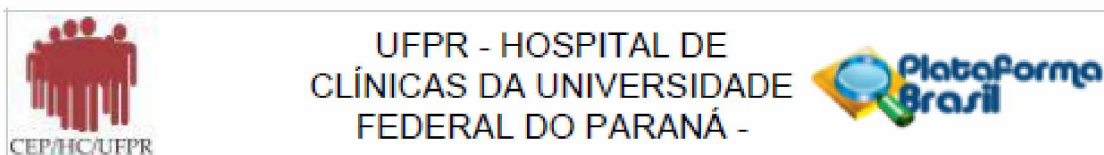
UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 2.426.777

metilação do DNA em cinco genes supressores de tumores (RASSF1a, p16 INK4a, TIMP3, PCQAP / MED15), em participantes com anemia de Fanconi.

Comparar o pH, capacidade tampão, níveis de lactato desidrogenase e fosfatase alcalina salivar e a metilação do DNA em cinco genes supressores de tumores (RASSF1a, p16 INK4a, TIMP3, PCQAP / MED15) dos participantes com AF a um grupo controle de participantes com falência medular;

Analisar as alterações no pH, capacidade tampão, níveis de lactato desidrogenase e fosfatase alcalina nos participantes com AF que apresentam lesões com potencial de malignidade.

Verificar a metilação do DNA em cinco genes supressores de tumores (RASSF1a, p16 INK4a, TIMP3, PCQAP / MED15) nos participantes com AF que apresentam lesões com potencial de malignidade.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Durante o protocolo de coleta de saliva, o paciente poderá se sentir constrangido, e o procedimento pode trazer algum descontentamento ou desconforto ao paciente, porém, serão tomados cuidados específicos para o resguardo do paciente e seus depoimentos, para que não haja prejuízos à integridade física e moral e o participante será previamente avisado quanto ao procedimento, tomando conhecimento da técnica para realização do mesmo e ficando livre para autorizar ou não a coleta. Os pesquisadores estarão usando equipamento de proteção individual completo (óculos de proteção, gorro, máscara, avental, e luvas descartáveis) e o kit de instrumentais / materiais para a coleta será previamente esterilizado para cada indivíduo.

Por outro lado, à realização deste estudo proporcionará como benefício para os participantes da pesquisa, orientações quando houver necessidade de tratamento odontológico; serão encaminhados pela equipe de pesquisadores a um consultório odontológico da UFPR para realizar o tratamento.

A colaboração e aceitação do participante, de forma espontânea e positiva, é fundamental para alcançar os objetivos propostos no estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo proporcionará como benefício para os participantes da pesquisa, orientações quando houver necessidade de tratamento odontológico; serão encaminhados pela equipe de pesquisadores a um consultório odontológico da UFPR para realizar o tratamento. A colaboração e aceitação do participante, de forma espontânea e positiva, é fundamental para alcançar os objetivos propostos no estudo.

Endereço: Rua Gal. Camello, 181
 Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, José Miguel Amenábar Céspedes e Talita Piassa Mafessoni, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando o(a) Senhor(a) a participar de um estudo intitulado “Avaliação de parâmetros salivares em indivíduos com anemia de Fanconi”,”. Este estudo visa analisar o pH; a capacidade tampão; os níveis de lactato desidrogenase e fosfatase alcalina na sua saliva e a presença de alterações (metilação) no DNA em cinco genes supressores de tumores (RASSF1a, p16 INK4a, TIMP3, PCQAP / MED15) presentes na sua saliva. Estes parâmetros poderão servir como indicadores de progressão de tumores em boca.

- a) O objetivo desta pesquisa é avaliar o PH, a capacidade tampão, os níveis de lactato desidrogenase e fosfatase alcalina salivar, assim como a metilação do DNA em cinco genes supressores de tumores (RASSF1a, p16 INK4a, TIMP3, PCQAP / MED15) na saliva de indivíduos com anemia de Fanconi.
- b) Caso você participe da pesquisa, será necessário coletar sua saliva durante um período de 5 minutos uma única vez.
- c) Para tanto você deverá estar presente no Hospital de Clínicas da UFPR para a realização da coleta da saliva por aproximadamente 5 minutos pela manhã, que poderá ser realizado enquanto você aguarda atendimento de consulta. Você não poderá comer, beber e escovar os dentes por uma hora antes da coleta da saliva. Ficará sentado e a cada 30 segundos cuspirá num recipiente, controlado pelo examinador.
- d) Existe o risco que durante o protocolo de coleta de saliva, você poderá se sentir com algum descontentamento ou desconforto, porém, serão tomados cuidados específicos para seu resguardo, para que não haja prejuízos à sua integridade física e moral.
- e) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: Encontrar componentes salivares que possam auxiliar no diagnóstico precoce de tumores na boca; quando houver necessidade de tratamento odontológico, serão encaminhados pela equipe de pesquisadores a um consultório odontológico da UFPR para realizar tratamento.
- f) O pesquisador José Miguel Amenábar Céspedes, professor adjunto da disciplina de Estomatologia da UFPR, pode ser contatado pelo telefone: 041 3360-4024 ou pelo email: jamenaba@gmail.com, colaboradora Talita Piassa Mafessoni pelo telefone 046 88119657 ou e-mail talitapiassa@gmail.com.

- g) Se (o Senhor, a Senhora) tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP/HC/UPFR pelo Telefone 3360-1041 das 08:00 horas as 14:00 horas de segunda a sexta-feira. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.
- h) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado.
- i) As informações relacionadas ao estudo poderão conhecidas por pessoas autorizadas, como os alunos de pós-graduação relacionados ao projeto. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade**.
- j) As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.
- k) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar esta decisão afete meu tratamento. Eu entendi o que não posso fazer durante a pesquisa, ficar uma hora antes da coleta da saliva sem comer, beber e escovar os dentes. Fui informado que serei atendido sem custos.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Nome completo, legível do Participante e/ou Responsável Legal

Assinatura do Participante e/ou Responsável Legal

Nome completo do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Assinatura do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive, de forma apropriada e voluntária, o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou seu representante legal para a participação neste estudo.

Nome completo do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Assinatura do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Curitiba, __/__/____

TERMO DE ASSENTIMENTO

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO (Adolescentes maiores de 12 anos menores de 18 anos).

Título do Projeto: Avaliação de parâmetros salivares em indivíduos com anemia de Fanconi.

Investigador: Pesquisador José Miguel Amenábar Céspedes

Local da Pesquisa: Serviço De Transplante De Medula Óssea (STMO) Do Hospital De Clínicas (HC) Da Universidade Federal Do Paraná.

Endereço: Rua General Carneiro, 181 - Curitiba/PR - CEP 80.060-900

O que significa assentimento?

O assentimento significa que você concorda em fazer parte de um grupo de adolescentes, da sua faixa de idade, para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer.

Pode ser que este documento denominado TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

1 Informação ao Paciente: o que é uma pesquisa?

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa, com o objetivo de avaliar o pH, a capacidade tampão, os níveis de lactato desidrogenase e fosfatase alcalina salivar, assim como a metilação do DNA em cinco genes supressores de tumores (RASSF1a, p16 INK4a, TIMP3, PCQAP / MED15) na saliva de indivíduos com anemia de Fanconi.

Para que fazer a pesquisa? Como será feita? Quais os benefícios esperados com a pesquisa?

Os parâmetros salivares avaliados neste estudo fornecerão informações importantes sobre o estado salivar associado à lesões com potencial de malignidade.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, como os alunos de pós-graduação relacionados ao projeto. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade**.

As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Que devo fazer se eu concordar voluntariamente em participar da pesquisa?

Caso você participe da pesquisa, será necessário coletar sua saliva durante um período de 5 minutos uma única vez. Para tanto você deverá estar presente no Hospital de Clínicas da UFPR para a realização da coleta por aproximadamente 5 minutos, que poderá ser realizado enquanto você aguarda sua consulta no Hospital.

Existe o risco que durante o protocolo de coleta de saliva, você poderá sentir algum descontentamento ou desconforto, porém, serão tomados cuidados específicos para seu resguardo, para que não haja prejuízos à sua integridade física e moral.

Os benefícios esperados com essa pesquisa são: Encontrar componentes salivares que possam auxiliar no diagnóstico precoce de tumores na boca; quando houver necessidade de tratamento odontológico, serão encaminhados pela equipe de pesquisadores a um consultório odontológico da UFPR para realizar tratamento.

A sua participação é voluntária. Caso você opte por não participar não terá nenhum prejuízo no seu atendimento e/ou tratamento.

Contato para dúvidas

Se você ou os responsáveis por você tiver(em) dúvidas com relação ao estudo, direitos do participante, ou no caso de riscos relacionados ao estudo, você deve contatar o(a) Investigador(a) do estudo ou membro de sua equipe. O pesquisador José Miguel Amenabar, professor adjunto da disciplina de Estomatologia da UFPR, pode ser contatado pelo telefone: 041 3360-4024 ou pelo email: jamenaba@gmail.com, colaboradora Talita Piassa Mafessoni pelo telefone 046 88119657 ou e-mail

talitapiassa@gmail.com, ou ainda na clínica de Odontologia da UFPR, localizada na Av. Lothário Meissner, 632. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP/HC/UPFR pelo Telefone 3360-1041 das 08:00 horas as 14:00 horas de segunda a sexta-feira. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos

DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que posso interromper a minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

Eu entendi a informação apresentada neste TERMO DE ASSENTIMENTO. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento DE ASSENTIMENTO INFORMADO.

Nome completo, legível do Participante menor de idade.

Assinatura do Participante menor de idade

Nome completo, do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Assinatura do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Curitiba: ____/____/____.